Applied Chemistry Today **20(74)** (2025) 139-160

Semnan University

Applied Chemistry Today

Journal homepage: https://chemistry.semnan.ac.ir/

ISSN: 2981-2437

*Research Article*

# Development and Step-by-Step Optimization of the HPLC Method with Dilute-and-Shoot Sample Preparation Technique for Determination of Benidipine Hydrochloride in Pharmaceutical and Biological Samples

**Fariba Mollarasouli***

*Department of Chemistry, Yasouj University, Yasouj, 75918-74831, Iran*

**PAPER INFO**

***Article history:***
*Received: 12/Oct/2024*
*Revised: 07/Feb/2025*
*Accepted: 19/Feb/2025*

**Keywords**:
High-performance liquid chromatography, Benidipine Hydrochloride, Blood serum sample, Human urine sample.

**ABSTRACT**

This research employed a method using high-performance liquid chromatography with a visible-ultraviolet detector (HPLC-UV-Vis) to measure Benidipine Hydrochloride in pharmaceutical, human urine, and serum samples. The proposed method was validated based on the guidelines of the International Conference on Harmonisation (ICH) after optimizing various chromatography conditions and other experimental parameters.
Optimal results were obtained using an ACE 5µm C18 column (150 mm × 6.4 mm; 0.5µm) at 45 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile: buffer (40 mM ammonium acetate) in a ratio of 75:25 v/v% adjusted to a pH of 6.75 at a flow rate of 0.1 mL/min. A wavelength of 238 nm was selected. The method was fully validated, and the validation parameters included a linear range of 0.15-25.00 mg/L and a correlation coefficient of 0.999 for all samples. The detection limits of Benidipine Hydrochloride were found to be 0.46, 1.20, and 8.30 µg/L in acetonitrile, serum, and human urine, respectively. The quantification limits in acetonitrile, serum, and human urine were 1.50, 3.80, and 27.00 µg/L, respectively. The precision, between-day and within-day, represented by the relative standard deviation (%RSD), was found to be 0.13% and 0.27% respectively in the buffer/acetonitrile solution. The average relative recovery values ranged between 97.00% and 105.00%. Thus, the proposed method is rapid and precise, and it can be successfully employed in pharmacokinetic studies and routine clinical performance.

DOI: https://doi.org/10.22075/chem.2025.35383.2311

© 2025 Semnan University.
This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license.(https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

* **.Corresponding author:** Assistant Professor of Analytical Chemistry. *E-mail address: f.mollarasouli@gmail.com*

**How to cite this article:** Mollarasouli, F. (2025). Development and Step-by-Step Optimization of the HPLC Method with Dilute-and-Shoot Sample Preparation Technique for Determination of Benidipine Hydrochloride in Pharmaceutical and Biological Samples. *Applied Chemistry Today*, 20(74), 139-160. (in Persian)

مقاله علمی پژوهشی

# توسعه و بهینه سازی مرحله به مرحله روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با تکنیک آماده سازی نمونه رقیق و تزریق مستقیم برای اندازه‌گیری بنیدیپین هیدروکلرید در نمونه‌های دارویی و بیولوژیکی

**فریبا ملارسولی***

*یاسوج، دانشگاه یاسوج، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی*

**اطلاعات مقاله**

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۲۱
بازنگری مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۱۹
پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

**کلمات کلیدی:**
کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا،
بنیدیپین،
سرم خون،
نمونه اورین انسان.

**چکیده**

*در این کار پژوهشی از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز مرئی- فرابنفش (HPLC-UV-Vis) برای اندازه‌گیری داروی بنیدیپین، در نمونه‌های دارویی، اورین انسان و نمونه‌ی سرم استفاده شده است. روش پیشنهادی پس از بهینه‌سازی شرایط مختلف کروماتوگرافی و سایر پارامترهای آزمایشی، بر اساس دستورالعمل‌های کنفرانس بین‌المللی هماهنگ‌سازی اعتبارسنجی شد. نتایج مطلوب با ستون ACE 5µm C18 (۱۵۰ میلی متر × ۴/۶۰ میلی متر؛ ۵/۰۰ میکرومتر) در ۴۵ درجه سانتی گراد به دست آمد. فاز متحرک شامل استونیتریل: بافر (۴۰ میلی مولار استات آمونیوم) با غلظت ۷۵: ۲۵ درصد حجمی-حجمی (V/V%) تنظیم شده در pH برابر ۶/۷۵ و با سرعت جریان ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه است. طول موج ۲۳۸ نانومتر انتخاب شد. روش به طور کامل اعتبارسنجی شد و پارامترهای اعتبارسنجی عبارت بودند از: محدوده خطی ۲۵/۰۰-۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر و ضریب همبستگی ۰/۹۹۹ برای همه نمونه ها. مقادیر حد تشخیص داروی بنیدیپین هیدروکلرید به ترتیب ۰/۴۶، ۱/۲۰ و ۸/۳۰ میکرو گرم بر لیتر در استونیتریل، سرم و اورین انسان یافت شد. مقادیر حد کمی سازی در استونیتریل، سرم و اورین انسان به ترتیب ۱/۵۰، ۳/۸۰ و ۲۷/۰۰ میکرو گرم بر لیتر بود. دقت بین روز و درون روز، که با انحراف استاندارد نسبی (RSD٪) نشان داده شده است، به ترتیب ۰/۱۳ و ۰/۲۷ درصد در محلول بافر/استونیتریل بدست آمد. میانگین مقادیر بازیابی نسبی بین ۹۷/۰۰٪ و ۱۰۵/۰۰٪ بود. بنابراین، روش پیشنهادی سریع و دقیق است و می‌تواند با موفقیت در مطالعات فارماکوکینتیک و عملکرد بالینی معمول استفاده شود.*

DOI: https://doi.org/10.22075/chem.2025.35383.2311

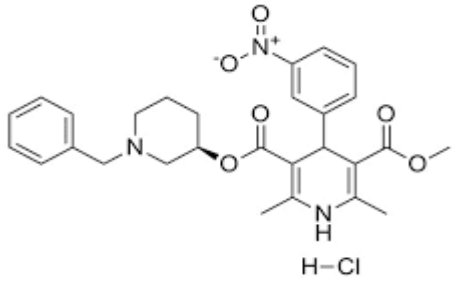
This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license.( https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

## ۱- مقدمه

بنیدیپین هیدروکلرید (BEN)، (±)-(R')-۳-(R')-۱-بنزیل-۳-پیپریدیل] متیل ۱، ۴ دی هیدرو-۲،۶-دی متیل-۴- (m-نیتروفنیل)- ۳، ۵-پیریدین کربوکسیلات هیدروکلرید (شماتیک ۱) یک مسدود کننده کانال کلسیم (CCB) مشتق شده از دی هیدروپیریدین با خواص کلی مشابه نیفدیپین است. این دارو، نفوذ پذیری عروقی نسبتاً بالایی دارد و انتظار می‌رود اثرات محافظتی بر روی سلول‌های اندوتلیال عروقی نشان دهد. این دارو به صورت خوراکی در مدیریت فشار خون بالا و آنژین قلبی استفاده می شود [۱،۲]. همچنین مشخص شده است که بنیدیپین به عنوان یک آنتاگونیست گیرنده مینرالوکورتیکوئید یا به عنوان یک ضد مینرالوکورتیکوئید عمل می‌کند. بنیدیپین باعث کاهش فشار خون سیستولیک و دیاستولیک و همچنین کاهش

ضربان قلب پس از درمان می‌شود. همچنین کاهش دفع پروتئین اورینی و تری گلیسیریدهای سرم گزارش شده است. مطالعات مختلف فعالیت آنتی اکسیدانی بنیدیپین، تحریک تولید NO، سرکوب بیان مولکول های چسبندگی، تحریک تمایز استئوبلاست، سرکوب تکثیر سلول‌های عضله صاف عروقی و سلول‌های مزانژیال و همچنین محافظت از میوکارد را نشان داده‌اند. افزایش تولید NO با اثرات محافظتی قلبی و ضد اسکلروتیک بنیدیپین همراه است [۳].

عوارض جانبی عمده مشاهده شده در گروه‌های با دوز بالا، عبارتنداز: رسوب چربی در کبد، افزایش وزن قلب و افزایش وزن تیموس. اما این عوارض پس از قطع دارو کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد ماهیت برگشت‌پذیری دارند. در بررسی هیستوپاتولوژیک قلب پس از درمان با این دارو، مشکل قابل توجهی مشاهده نشد. در مطالعه فارماکولوژیک عمومی روی موش‌ها و موش‌های صحرایی، درمان با بنیدیپین در درمان خوراکی با دوز بالا (۱۰ تا ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) گاهی اوقات منجر به علائم سرکوب فعالیت سیستم عصبی مرکزی (مانند سرکوب حرکت خودبه‌خودی) می‌شود که به نظر می‌رسد به کاهش بیش از حد فشار خون این دارو مربوط است. این دارو، نه علایم سرطان زایی و نه آنتی‌ژنی را نشان نداد. بنابراین اندازه‌گیری بنیدیپین از جنبه بالینی از اهمیت بالایی برخوردار است. تکنیک‌های مختلفی برای اندازه‌گیری مقادیر بنیدیپین در نمونه‌های زیستی و ترکیبات دارویی نظیر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۱،۲]، الکتروشیمی [۱] و اسپکتروسکوپی [۴–۷] گزارش شده است که بعضی از این روش‌ها، از معایبی نظیر زمان آنالیز بالا، حساسیت و گزینش‌پذیری پایین و در برخی موارد نیاز به پیش‌تیمار نمونه سخت و پیچیده رنج می‌برند که باعث نامناسب بودن آنها برای اندازه‌گیری شده است. بنابراین، یافتن روشی مناسب با حساسیت بالا، ساده و کارآمد برای اندازه‌گیری این دارو ضروری می‌باشد.




شماتیک ۱– ساختار شیمیایی بنیدیپین هیدروکلرید

به دلیل استفاده گسترده از روش کروماتوگرافی مایع در آنالیزهای روتین، مهم است که روش‌های کروماتوگرافی مایع کاملاً تأیید شده برای آنالیز مواد فعال دارویی (APIs ها) در اشکال دوز آن‌ها توسعه داده شوند. روش‌های HPLC-UV مزایای مهمی مانند راه‌اندازی سریع، ابزاری دقیق، تطبیق پذیری و هزینه کم را ارائه می‌دهند و ثابت شده است که روشی ارزشمند در کنترل کیفیت

داروها می‌باشد [۸–۱۳]. روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری بنیدیپین هیدروکلراید وجود دارد که بسته به نوع نمونه (فرمولاسیون دارویی، بیولوژیک و ...) و تجهیزات موجود می‌تواند متفاوت باشد. چند روش مرجع رایج برای آنالیز بنیدیپین هیدروکلرید عبارتنداز: روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، طیف سنجی UV-Vis، تیتراسیون، الکتروفورز مویین، کروماتوگرافی گازی (GC) یا کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی (LC-MS). معمولاً HPLC به عنوان روش اصلی و مرجع برای اندازه‌گیری بنیدیپین هیدروکلراید در نظر گرفته می‌شود.

تعداد کمی از تکنیک‌های تجزیه‌ای در حال حاضر برای تعیین BEN در فرمولاسیون‌ها منتشر شده‌اند که عمدتاً روش‌های بیوانالیتیک هستند که شامل BEN ترکیب شده با داروی دیگری می‌باشند. هدف از کار حاضر، توسعه یک روش تجزیه‌ای HPLC سریع، حساس و دقیق است که برای بررسی پایداری دارو تحت شرایط استرس مختلف و نیز اندازه‌گیری محتوای دارو در فرمولاسیون‌های موجود، تأیید شده است. در این پژوهش، از روش رقیق‌سازی و تزریق مستقیم که یک فرایند ساده است که به طور معمول برای اندازه‌گیری داروها در ماتریس‌های بیولوژیکی مانند ادرار استفاده می‌شود، به این صورت که نمونه قبل از تزریق مستقیم به سیستم کروماتوگرافی مایع (LC) رقیق می‌شود و سپس به طور مستقیم به سیستم کروماتوگرافی مایع تزریق می‌شود. این روش آسان، سریع و باعث صرفه‌جویی در هزینه است و می‌تواند برای نمونه‌های مایع با پروتئین کم مانند ادرار مناسب باشد. این روش فرآیند آماده‌سازی نمونه را ساده می‌کند و آن را برای آنالیز دارو مؤثر می‌سازد. با این‌حال، بهینه‌سازی و اعتبارسنجی روش HPLC برای دقت و صحت نتایج، به‌ویژه هنگام آنالیز ماتریس‌های پیچیده مانند پلاسما و سرم خون، بسیار مهم است. به این منظور، تمامی پارامترهای روش HPLC بهینه سازی شد و اعتبارسنجی روش انجام شد. ارقام شایستگی روش در شرایط بهینه گزارش شد و با سایر روش‌های تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری این دارو مقایسه شد. نتایج حاکی از این است که روش پیشنهادی در مقایسه با سایر روش‌های گزارش شده تا به امروز، دارای حد تشخیص پایین‌تر، مقدار RSD درصد کوچکتر، زمان آنالیز کوتاه‌تر و از منظر اجرا، ساده‌تر است و نیاز به آماده‌سازی نمونه و یا روش‌های جداسازی و استخراج نمونه پیش از تزریق نمونه به دستگاه ندارد و تنها با رقیق سازی نمونه و تزریق مستقیم نمونه به دستگاه، اندازه‌گیری صورت می‌گیرد.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱-مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

بنیدیپین هیدروکلرید و دوز دارویی آن از قرص Coniel®tablets توسط شرکت دوا ( Deva استانبول، ترکیه) تهیه شد. همه مواد شیمیایی و حلال‌ها از گرید HPLC بودند. برای تعیین حجم مرده از پتاسیم بروماید سیگما آلدریچ (مونیخ، آلمان) استفاده شد. استونیتریل با درجه خلوص HPLC از شرکت مرک آلمان به منظور اصلاح کننده آلی فاز متحرک استفاده شد. آمونیوم استات برای تهیه فاز متحرک از شرکت مرک خریداری شد. اسید هیدروکلریک، پراکسید هیدروژن (۳۰٪) و هیدروکسید سدیم

(از شرکت مرک آلمان) برای مطالعات تخریب استفاده شدند. نمونه اورین توسط داوطلبان سالم ارائه شد. هیچ تاییدیه اخلاقی مورد نیاز نبود زیرا نمونه اورین از خود محققین به صورت داوطلبانه گرفته شد. سرم انسان مصنوعی بدون دارو از سیگما آلدریچ (مونیخ، آلمان) تهیه شد.

### ۲-۲-دستگاه‌های مورد استفاده

سیستم کروماتوگرافی مورد استفاده در کار پیشنهادی، سیستم LC سری Agilent 1100 (Wilmington، DE، USA)، مجهز به گاززدای مدل G1379A، پمپ چهارتایی G1311A، انژکتور خودکار G1313 و دتکتور UV ا ست. pH متر ترمو ساینتیفیک بنچ تاپ (Orion 3 Star™ Plus, USA) برای اندازه گیری pH و حمام اولتراسونیک (Bandelin Sonorex Super، برلین، آلمان) برای فرآیندهای فراصوت مانند گاز زدایی فاز متحرک انجام شد. آب دیونیزه از سیستم Milli-Q (میلیپور، میلفورد، MA، ایالات متحده آمریکا) به دست آمد و برای تهیه تمام محلول‌های مورد نیاز استفاده شد. اولتراسانتریفیوژ (Optima™ L-90 K, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) برای تهیه محلول‌های تست بازیابی (ریکاوری) استفاده شد.

### ۲-۳-شرایط کروماتوگرافی و مراحل اعتبار سنجی

یک فاز متحرک ایزوکراتیک با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه که حاوی مخلوطی از استونیتریل و ۵ میلی مولار بافر استات آمونیوم با نسبت حجمی-حجمی ۲۵:۷۵ (V/V) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از ستون Agilent XDB(µm ۵؛ ۴/۶ mm × ۱۵۰ mm) شرکت فنومنکس آمریکا در طول موج تشخیص ۲۳۸ نانومتر برای آنالیز و اندازه‌گیری بنیدیپین هیدروکلرید استفاده شد. حجم تزریق ۱۵ میکرولیتر تنظیم شد و قبل از اولین تزریق، ستون در دمای بهینه ۴۵ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه تنظیم شد. pH فاز متحرک روی ۶/۷۵ تثبیت شد.

فازهای متحرک از پیش تهیه شده در یک حمام اولتراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه گاز زدایی شدند و سپس با استفاده از پمپ خلاء از طریق غشای ۰/۴۵ میکرومتر، فیلتراسیون اعمال شد [۱۴]. شرایط کروماتوگرافی بهینه بر اساس دستورالعمل کنفرانس بین المللی هماهنگ سازی (ICH) اعتبارسنجی شد [۱۵]. با توجه به دستورالعملICH ، پارامترهای ارزیابی شده شامل مناسب بودن سیستم، گزینش‌پذیری، خطی بودن و محدوده‌ی خطی بودن، حد تشخیص (LOD)، حد کمی‌سازی (LOQ)، دقت و صحت هستند.

### ۲-۴-آماده‌سازی محلول‌های مادر و تهیه نمونه‌های تنش برای سنجش پایداری

محلول‌های استاندارد مادر BEN در استونیتریل با غلظت‌های تقریباً ۱۰۰ گرم بر میلی‌لیتر و محلول‌های کاری با رقیق‌سازی محلول مادر با استفاده از فاز متحرک تهیه شدند. غلظت BEN برای مطالعات LC در محدوده ۲۵/۰۰ -۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر متغییر بود.

مطالعات تخریب به منظور ارزیابی توانایی روش پیشنهادی برای جداسازی BEN از محصول تخریب آن در شرایط قرارگیری در معرض نور UV، اسید، باز، اکسیداسیون و حرارت (در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد) انجام شد [۱۶]. تجزیه حرارتی و نوری BEN در مواد خام در حالت جامد انجام شد. پس از تجزیه، محلول‌های مادر با حل کردن در استونیتریل برای دستیابی به غلظت نهایی ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آماده شدند.

از این محلول‌ها مقدار کمی با فاز متحرک رقیق شد تا به غلظت نهایی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر برسد. تست خلوص پیک برای پیک BEN با استفاده از دتکتور UV-Vis در نمونه‌های تنش انجام شد. روش بهینه شده برای مطالعه رفتار تخریب اجباری BEN مورد استفاده قرار گرفت. قبل از آنالیز نمونه‌های تحت تنش، بلنک مناسب تزریق شد. برای تست تنش حرارتی، نمونه‌های ماده دارویی به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای کنترل شده در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

برای تجزیه اسیدی، قلیایی و اکسیداتیو، محلول‌هایی با حل کردن مواد خام BEN در استونیتریل تهیه شد. از این محلول، مقدار کمی با HCl، NaOH و $H_2O_2$ رقیق شد تا غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در هر محلول به دست آید. هیدرولیز اسیدی و قلیایی BEN در حالت محلول با ۰/۱ مولار و ۱/۰ مولار از HCl و NaOH در دمای بهینه ۴۵ درجه سانتیگراد در مدت زمان‌های مختلف به طور جداگانه انجام شد. برای تنش اکسیداتیو، محلول‌های نمونه BEN در حالت محلول با ۰/۳٪ و ۳/۰٪ $H_2O_2$ در مدت زمان‌های مختلف نگهداری شد. برای تنش فوتولیتیک، نمونه‌هایی از بنیدیپین هیدروکلرید در حالت جامد با تابش UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر به مدت حداکثر ۲۴ ساعت تحت تابش قرار گرفتند.

### ۲-۵-روش سنجش قرص و صحت روش

۱۰ عدد قرص Coniel® که هر کدام حاوی ۴/۰ میلی گرم BEN بود، به دقت وزن شده و تا رسیدن به پودر ریز همگن در هاون خرد شد. وزن دقیقی از این پودر (معادل یک قرص وزن شده)، به یک بالون ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شده، و با استونیتریل رقیق شد. پس از حدود ۱۰ دقیقه همزدن و حل کردن، با همان حلال به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می‌رسد. این محلول با استفاده از کاغذ صافی، صاف شده و در یک بالون تمیز جمع آوری شد. محلول نهایی دارو با رقیق کردن این محلول با الکترولیت نگهدارنده انتخاب شده (محلول نهایی حاوی ۵۰٪ استونیتریل) و با فاز متحرک تهیه شد. مقدار محتوای BEN از معادلات رگرسیون مربوطه محاسبه شد. به منظور نشان دادن کاربرد روش، آزمایش‌های بازیابی با افزودن مقدار مشخصی از BEN خالص به قرص‌های از پیش آنالیز شده، انجام شد. مقادیر معلوم BEN خالص به دوز قرص اضافه شد و مخلوط‌ها آنالیز شدند. درصد بازیابی نسبی با مقایسه غلظت به‌دست‌آمده از نمونه‌های اسپایک شده با غلظت افزوده واقعی محاسبه شد.

## ۳- بحث و نتیجه‌گیری

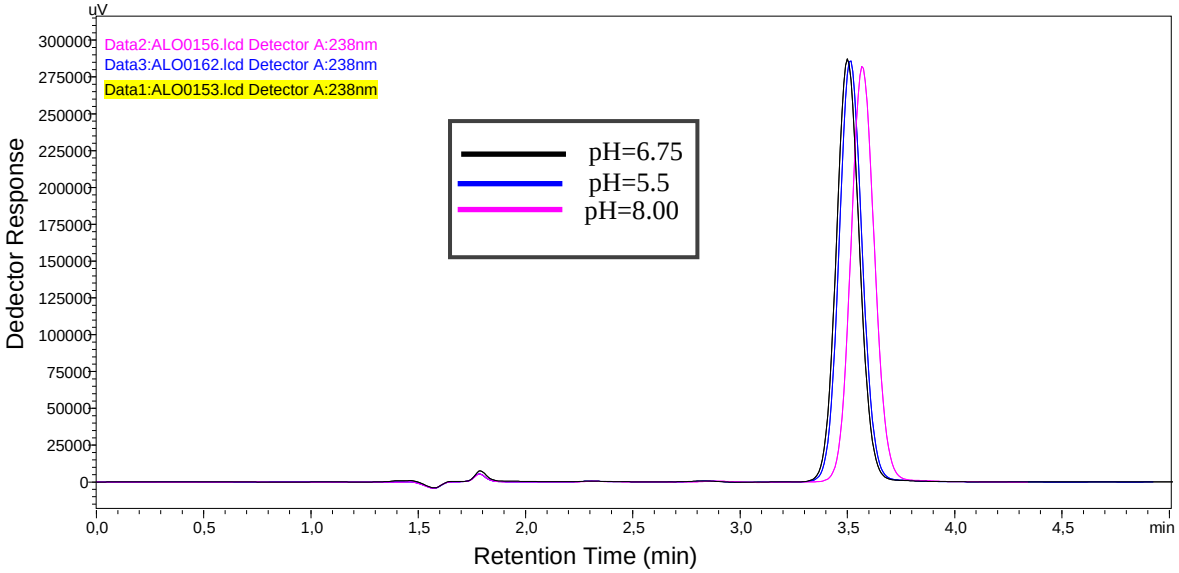
### ۳-۱- بهینه سازی پارامترهای موثر در روش HPLC

اولین قدم برای اعتبارسنجی یک روش تجزیه‌ای، تعیین شرایط بهینه برای این روش است. از آنجایی که در این مطالعه از روش HPLC استفاده شده است، در کار پژوهشی حاضر، تأثیر عوامل مختلف از جمله نوع ستون کروماتوگرافی، ترکیب فاز متحرک، نوع بافر، غلظت و pH بافر، سرعت جریان، دمای ستون و نوع حلال آلی که می‌توانند بر روی مکانیسم بازداری و گزینش‌پذیری تاثیر گذارند، مورد بررسی قرار گرفت. حداکثر جذب بنیدیپین در ۲۳۸ نانومتر یافت شد و آشکارساز در این طول موج برای همه آنالیزها تنظیم شد (شکل پ۱).

#### ۳-۱-۱- بهینه سازی فاز متحرک

به منظور به دست آوردن پیک‌های تیز و به خوبی جدا شده، آزمایش‌های زیادی با ترکیبات فاز متحرک مختلف که شامل استونیتریل و محلول بافر استات آمونیوم است، انجام شد. در آزمایش‌های اولیه، استونیتریل به‌عنوان یک اصلاح‌کننده آلی فاز متحرک با استفاده از درصدهای مختلف محلول بافر استات آمونیوم مورد آزمایش قرار گرفت. درصدهای مختلف محلول بافر از ۵ درصد تا ۳۰ درصد (شکل پ۲) و مقادیر pH متفاوت از ۵/۵ تا ۸/۰ (شکل پ۳) نیز برای جدایش پیک (رزولوشن) کارآمد و شکل پیک تیزتر با استفاده از بافر استات ارزیابی شدند.

علاوه بر این، جدایش پیک و زمان بازداری تحت تأثیر مقدار حلال آلی است. در حالیکه، با توجه به کروماتوگرام ها (شکل ۱)، تغییرات pH بر شکل پیک، جدایش پیک و زمان بازداری تاثیر چندانی ندارد، و فقط به مقدار جزیی، زمان بازداری با افزایش pH افزایش می‌یابد. از آنجاییکه مقدار pKa بنیدیپین برابر با pH خنثی (pH=7.34) است [۱]. تاثیر ناچیز pH در زمان بازداری می‌تواند به دلیل تغییر در فرآیند پروتونه‌سازی–دپروتونه‌سازی بخش کربوکسیلات مولکول باشد. در pH > pKa، باید باز مزدوج آن از طریق گسستگی سریع فرم پروتونه‌شده شکل بگیرد. لذا pH=۶/۷۵ بدلیل زمان بازداری بهتر، تعداد تشتک‌های فرضی (N) بیشتر و نیز pH نزدیک به pH خنثاییت و بیولوژیکی به عنوان pH بهینه در اندازه‌گیری داروی بنیدیپین هیدروکلرید انتخاب شد. غلظت محلول بافر با تهیه غلظت‌های مختلف استات آمونیوم در محدوده بین ۵/۰ و ۴۰/۰ میلی مولار مورد بررسی قرار گرفت (شکل پ۴). هنگامی که نتایج بررسی شد، غلظت بافر ۴۰ میلی مولار به عنوان غلظت بهینه بافر انتخاب شد. در نهایت، تأثیر نوع محلول بافر بر آنالیز بررسی شد و مشاهده شد که بنیدیپین به خوبی با هر سه نوع بافر جدا شد (شکل پ۵). هنگامی که زمان آنالیز کل، شکل پیک و وضوح مورد ارزیابی قرار گرفت، استات آمونیوم به عنوان محلول بافر برای جداسازی بهتر بنیدیپین مناسب تشخیص داده شد.

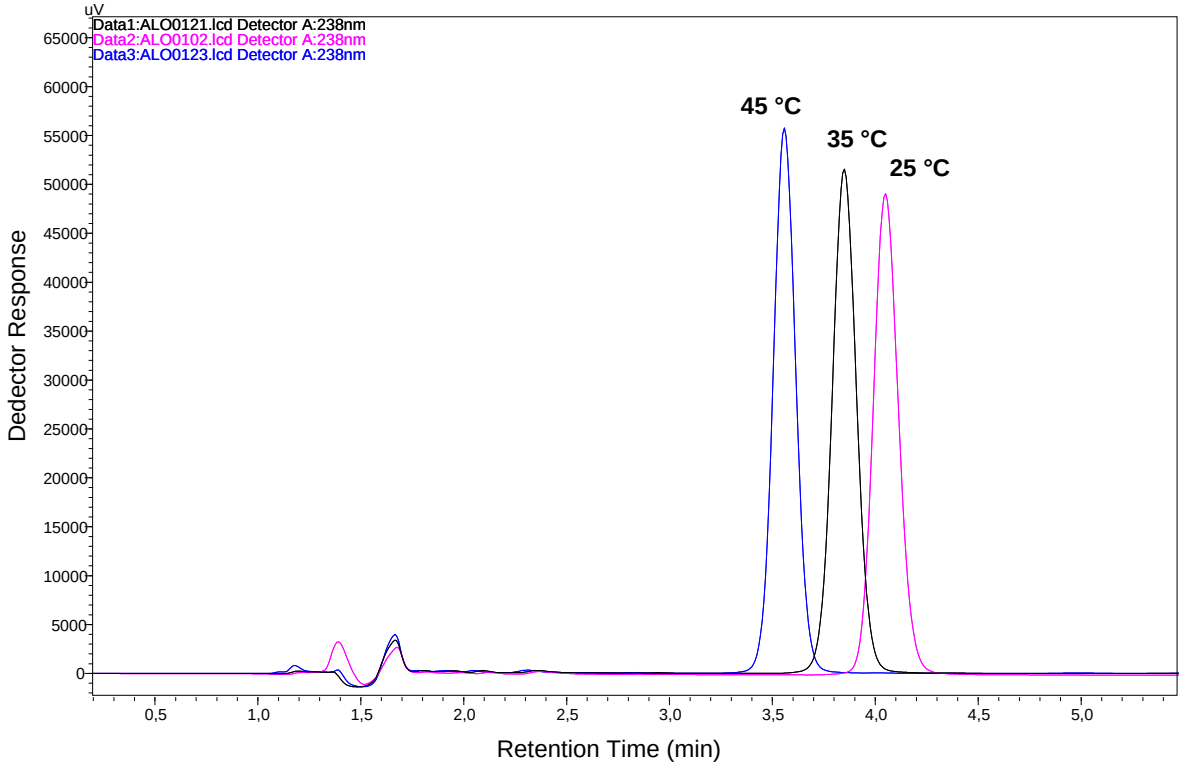



شکل ۱- بهینه سازی pH فاز متحرک. شرایط: ستون ACE 5µm C18 (۱۵۰ میلی متر × ۴/۶ میلی متر؛ ۵/۰ میکرومتر)، سرعت جریان: ۱/۰ میلی‌لیتر در دقیقه، دمای ستون: °C ۴۵، طول موج: ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک: استونیتریل: ۴۰ میلی مولار بافر آمونیوم استات (۲۵/۷۵؛ v/v)، ۱۵ میکرولیتر تزریق از ۲۰ میکرومولار بنیدیپین.

### ۳-۱-۲- بهینه سازی دمای کوره ستون و سرعت جریان فاز متحرک

دمای کوره ستون، یک پارامتر مهم در HPLC است. به منظور بررسی تاثیر دمای ستون، دما بین ۲۵ تا ۴۵ درجه تغییر داده شد. طبق شکل ۲ ملاحظه گردید که با افزایش دما، بازداری بنیدیپین در ستون کمتر می‌شود و سریعتر از ستون خارج می‌شود. همچنین با افزایش دما، شدت سیگنال مشاهده شده افزایش می‌یابد. لذا، با توجه به سطح زیر منحنی بیشتر و زمان بازداری کمتر، دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه انتخاب گردید.

افزایش سرعت جریان فاز متحرک در مطالعات کروماتوگرافی، فشار ستون را افزایش می‌دهد و زمان آنالیز را کوتاه می‌کند. این وضعیت همچنین ممکن است باعث فشار بیش از حد برای آسیب رساندن به فاز ساکن شود. به همین دلیل، بهینه سازی سرعت جریان فاز متحرک در کروماتوگرافی، امری ضروری می‌باشد. بدین منظور، تاثیر سرعت جریان سیستم در بازه ۰/۷ میلی لیتر بر دقیقه تا ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه بررسی شد. همانطور که از نتایج به وضوح مشاهده می‌شود (شکل پ۶ و جدول پ۱)، با افزایش سرعت جریان، تعداد تشتک‌های فرضی و قدرت تفکیک پیک کاهش پیدا کرده است. در این بین، زمان آنالیز نیز کوتاه‌تر شده است. بنابراین، سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه، به عنوان دبی بهینه انتخاب شد.




شکل ۲- بهینه سازی دمای ستون. شرایط: ستون ACE 5µm C18 (۱۵۰ میلی متر × ۴/۶ میلی متر؛ ۵/۰ میکرومتر)، سرعت جریان: ۱/۰ میلی‌لیتر در دقیقه، pH: ۶/۷۵، طول موج: ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک: استونیتریل: ۴۰ میلی مولار بافر آمونیوم استات (۲۵/۷۵؛ v/v)، ۱۵ میکرولیتر تزریق از ۲۰ میکرومولار بنیدیپین.

در نتیجه مطالعات بهینه سازی، شرایط بهینه شده نهایی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱- پارامترهای بهینه شده سیستم کروماتوگرافی

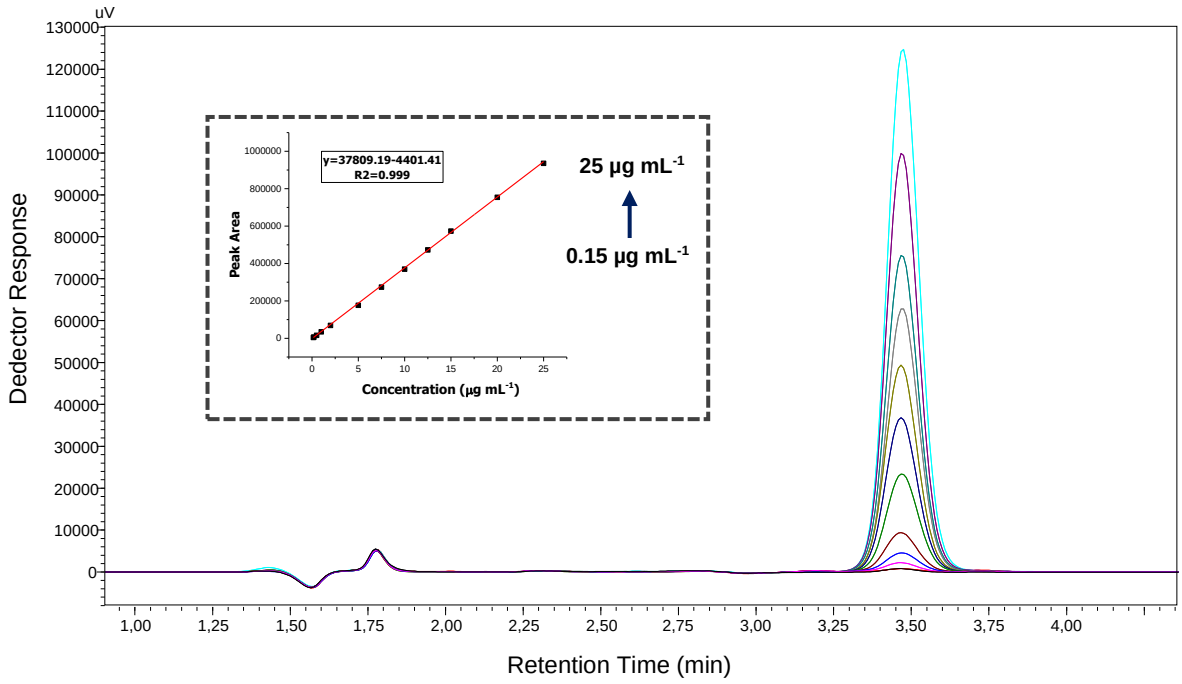
| پارامتر | شرایط بهینه شده |
|---|---|
| ستون | ACE ۵µm C۱۸ |
| فاز متحرک | ۷۵:۲۵ ACN:AA ۴۰ mM |
| pH | ۶/۷۵ |
| دما (°C) | ۴۵ |
| سرعت جریان ($mL\ min^{-1}$) | ۱/۰۰ $mL\ min^{-1}$ |
| حجم تزریق (µL) | ۱۵ µL |
| طول موج (nm)) | ۲۳۰ nm |

## ۳-۲- اعتبار سنجی روش HPLC

### ۳-۲-۱- بررسی خطی بودن و رسم منحنی کالیبراسیون (درجه بندی)

اعتبار یک روش تجزیه‌ای با هدف اطمینان از قابل قبول و قابل اعتماد بودن روش توسعه یافته برای هدف کاربردی آن است. مطابق با دستورالعمل‌های ICH [۱۷]، روش HPLC توسعه‌یافته برای پارامترهای اعتبارسنجی مختلف مانند مناسب بودن سیستم، خطی بودن، دقت، صحت، LOD و LOQ تأیید شد. خطی بودن، توانایی روش تجزیه‌ای توسعه یافته برای بررسی رابطه

بین پاسخ دتکتور (سیگنال) در مقابل غلظت خطی یا غیر خطی بودن آن است [۱۸]. خطی بودن روش در محدوده غلظت‌های مختلف (۰/۱۵ تا ۲۵ میلی گرم بر لیتر) از بنیدیپین مورد آزمایش قرار گرفت. داده‌های آنالیز رگرسیون برای منحنی کالیبراسیون (شکل ۳) رابطه خطی را در این محدوده غلظت برای بنیدیپین نشان می‌دهد. مقدار ضریب همبستگی $R^2 > 0.999$ است، که همبستگی عالی و خطی بودن خوب را برای روش بهینه‌شده پیشنهاد می‌کند. LOD معمولاً به عنوان حداقل مقدار یا غلظت قابل شناسایی یک جزء که می‌تواند به‌طور قابل اعتمادی با استفاده از یک روش تجزیه‌ای خاص شناسایی شود، تعریف می‌شود. به عبارت دیگر، LOD پایین‌ترین مقدار یا غلظت یک آنالیت در یک نمونه آزمایش است که می‌تواند به‌طور قابل اعتمادی از صفر تشخیص داده شود. تخمین معمول LOD در کروماتوگرافی شامل اندازه‌گیری نسبت سیگنال به نویز (S/N) است. مقدار سیگنال کروماتوگرافی به ارتفاع پیک آنالیت و مقدار نویز بستگی دارد. مقدار نویز می‌تواند از انحراف معیار نویز یا از آنچه که به‌عنوان مقدار پیک به پیک نامیده می‌شود، به‌دست آید. معیارهای جهانی پذیرفته‌شده برای شناسایی یک آنالیت نسبت S/N برابر با یا بالاتر از ۳ است. همچنین، حد کمی‌سازی (LOQ) نیز بر اساس نسبت سیگنال به نویز ۱۰ به‌دست آمده است [۱۹]. بر این اساس، مقادیر LOD و LOQ به ترتیب ۰/۴۶ و ۱/۵۰ میکروگرم بر لیتر بدست آمد. نتایج در جدول ۲ به تفصیل ارائه شده‌اند. از مقادیر LOD و LOQ استنباط شد که روش بهینه برای اندازه گیری بنیدیپین از حساسیت و حد تشخیص خوبی برخوردار است.




شکل ۳- کروماتوگرام‌های معمول HPLC تحت شرایط بهینه شده در محدوده‌ی غلظتی ۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر تا ۲۵ میلی گرم بر لیتر در محلول بافر. شکل داخلی نمایانگر نمودار کالیبراسیون در این بازه غلظتی می‌باشد.

جدول ۲- پارامترهای اعتبارسنجی بنیدیپین هیدروکلرید در محلول بافر

| پارامترهای اعتبارسنجی | نتایج |
|---|---|
| محدوده خطی ($mg\ L^{-1}$) | ۰/۱۵-۲۵/۰۰ |
| شیب | ۳۷۸۰۹/۱۹ |
| عرض از مبدا | -۴۴۰۱/۴۱ |
| ضریب همبستگی | ۰/۹۹۹ |
| انحراف استاندارد شیب | ۱۹۶/۵۳ |
| انحراف استاندارد عرض از مبدا | ۲۶۴/۰۲ |
| حد تشخیص ($\mu g\ L^{-1}$) (LOD) | ۰/۴۶ |
| حد کمی سازی($\mu g\ L^{-1}$) (LOQ) | ۱/۵۰ |
| * دقت بین‌روز(RSD%) | ۰/۱۳ |
| * دقت داخل‌روز(RSD%) | ۰/۲۷ |

* هر عدد میانگین ۵ آزمایش است.

**۳-۲-۲- دقت**

دقت میزان توافق بین نتایج انفرادی است. معمولاً به صورت انحراف استاندارد یا انحراف استاندارد نسبی بین آنالیزهای تکراری بیان می‌شود [۱۸]. در مطالعه حاضر، برای ارزیابی دقت، از سنجش داخل‌روز و بین‌روز استفاده شد. تجزیه و تحلیل دقت در یک روز در فواصل زمانی مختلف با تعیین تکرارپذیری (دقت در داخل‌روز)، و در سه روز متوالی، با تعیین دقت متوسط (بین‌روز) انجام شد. به عنوان نتیجه، مقادیر RSD درصد برای هر دو مطالعات دقت (داخل‌روز و بین‌روز) کمتر از دو درصد می‌باشد (جدول ۲) که قابل قبول بوده و نشان‌دهنده دقت بالای روش پیشنهادی می‌باشد.

**۳-۲-۳- صحت**

نزدیک بودن مقدار تجربی و واقعی یا یک مقدار مرجع پذیرفته شده نشان دهنده صحت روش تجزیه‌ای است. هم دقت و هم صحت مربوط به تکرارپذیری روش است و با آزمایش‌های بازیابی تعیین می‌شود [۱۸]. مقادیر مشخصی از محلول استاندارد بنیدیپن در محدوده غلظتی (۱/۲۵ تا ۷/۵۰ میلی گرم بر لیتر) به محلول قرص تجاری بنیدیپن با دوز ۵ میلی گرم بر لیتر اسپایک شد و آنالیز محلول اسپایک شده با روش پیشنهادی انجام شد (جدول ۳). میانگین درصد بازیابی برای نمونه قرص تجاری با دوز ۵ میلی گرم بر لیتر در محدوده ۹۸/۰۲ تا ۱۰۲/۸۱ درصد بدست آمد. همه نتایج نشان دهنده RSD% پایین‌تر از ۲ (RSD<2) و مقادیر بازیابی خوب است، که حاکی از صحت و دقت عالی برای روش پیشنهادی است.

**۳-۲-۴- نیرومندی روش[1]**

طبق ICH ، استحکام یک روش تجزیه‌ای، معیاری برای سنجش توانایی آن در بی‌تأثیر ماندن از تغییرات کوچک، اما عمدی در پارامترهای روش است و نشانه‌ای از قابلیت اطمینان آن در طول استفاده عادی را ارائه می‌دهد.

[1] Robustness

نتایج مربوطه مطابق با معیارهای پذیرش RSD در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۳- نتایج آنالیز بنیدیپین هیدروکلرید در نمونه قرص تجاری

| | مقادیر | | | |
|---|---|---|---|---|
| مقدار واقعی ($mg\ L^{-1}$) | ۵/۰۰ | | | |
| مقدار پیدا شده ($mg\ L^{-1}$) | ۴/۸۵ | | | |
| RSD (%) * | ۰/۴۷ | | | |
| درصد خطای نسبی (٪) | ۳/۰۰ | | | |
| مقدار اسپایک شده ($mg\ L^{-1}$) | ۱/۲۵ | ۲/۵۰ | ۵/۰۰ | ۷/۵۰ |
| مقدار یافت شده ($mg\ L^{-1}$) | ۶/۱۷ | ۷/۷۱ | ۱۰/۱۷ | ۱۲/۲۵ |
| درصد بازیابی نسبی (RR٪) | ۹۸/۶۶ | ۱۰۲/۸۱ | ۱۰۱/۷۷ | ۹۸/۰۲ |
| درصد بازیابی اسپایک (SR٪) | ۹۸/۴۰ | ۱۰۴/۲۰ | ۱۰۳/۴۰ | ۹۵/۰۰ |
| RSD * برای ریکاوری درصد | ۰/۱۲ | ۰/۰۹ | ۰/۱۰ | ۰/۱۲ |
| درصد خطای نسبی اسپایک (٪) | ۱/۲۸ | ۲/۸۰ | ۱/۷۰ | ۲/۰۰ |

* هر عدد میانگین ۱۰ تکرار است.

جدول ۴-بررسی نیرومندی روش در شرایط مختلف

| شرایط | زمان بازداری (دقیقه) | پاسخ (غلظت برحسب میکروگرم بر میلی لیتر) |
|---|---|---|
| سرعت جریان ($mL\ min^{-1}$): ۱/۱۰ | ۳/۲۰ | ۶۱/۱۲ |
| SD | ۰/۰۲ | ۰/۸۱ |
| RSD% | ۰/۵۱ | ۱/۵۷ |
| سرعت جریان ($mL\ min^{-1}$): ۰/۹۰ | ۳/۸۵ | ۶۲/۱۴ |
| SD | ۰/۰۴ | ۰/۵۶ |
| RSD% | ۱/۰۷ | ۱/۰۷ |
| دما: $^{0}C$ ۴۳ | ۳/۶۱ | ۶۰/۱۹ |
| SD | $۸/۰۰ \times ۱۰^{-۳}$ | ۰/۱۱ |
| RSD% | ۰/۲۳ | ۰/۱۸ |
| دما:$^{0}C$ ۴۷ | ۳/۴۴ | ۶۰/۸۲ |
| SD | ۰/۰۲ | ۰/۶۲ |
| RSD% | ۰/۶۰ | ۱/۰۲ |
| درصد استونیتریل (۷۶٪) | ۳/۳۲ | ۵۹/۳۰ |
| SD | ۰/۰۲ | ۰/۴۳ |
| RSD% | ۰/۶۲ | ۰/۷۳ |
| درصد استونیتریل (۷۴٪) | ۳/۶۳ | ۵۸/۷۰ |
| SD | ۰/۰۱ | ۰/۵۸ |
| RSD% | ۰/۳۴ | ۱/۰۱ |
| طول موج: ۲۳۹ نانومتر | ۳/۵۴ | ۵۸/۸۰ |
| SD | $۵/۰۰ \times ۱۰^{-۳}$ | ۰/۰۸ |
| RSD% | ۰/۱۳ | ۰/۱۴ |
| طول موج: ۲۳۷ نانومتر | ۳/۵۵ | ۵۸/۱۳ |
| SD | $۵/۰۰ \times ۱۰^{-۳}$ | ۰/۵۸ |
| RSD% | ۰/۱۲ | ۰/۹۹ |

**۳-۲-۵- خطیت، دقت و صحت در ماتریس‌های اورین و سرم خون انسان**

خطی بودن روش پیشنهادی در ماتریس‌های سرم خون و اورین انسانی (شکل ۴ الف و ب) با تجزیه و آنالیز سطوح غلظت‌های مختلف بنیدیپین از مساحت سطح زیر پیک تعیین شد. مساحت سطح زیر پیک با غلظت‌های مربوطه برای ساخت منحنی کالیبراسیون همبستگی داشتند. خطیت و پارامترهای معادله رگرسیون برای نمونه سرم خون انسان و نمونه اورین انسانی به ترتیب در جداول ۵ و ۶ ذکر شده است. محدوده خطی $mg\ L^{-1}$ ۰/۱۵-۲۵/۰۰ برای هر دو ماتریس (سرم خون و اورین) یافت شد. هنگامی که مقادیر RSD درون روز و بین روز مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که نتایج تکرارپذیری در همه ماتریس‌ها به دست آمد. علاوه بر این، مشخص شد که LOD و LOQ در هر ماتریس متفاوت است. نمونه‌های حقیقی اسپایک شده با غلظت‌های شناخته شده از آنالیت‌ها به ما این امکان را داد تا صحت روش را با مقایسه غلظت‌های اندازه‌گیری شده با آنچه که در جدول ۶ تا ۸ نشان داده شده است، ارزیابی کنیم. برای کمی‌سازی آنالیت در نمونه‌های حقیقی، از روش افزودن استاندارد استفاده می‌شود. آنالیت در طی این فرآیند در چهار غلظت مختلف (۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۳/۵۰ میلی گرم بر لیتر) به نمونه‌های حقیقی (سرم خون و اورین انسان) اضافه شدند. میزان بازیابی نسبی (RR)، نسبت غلظت بدست آمده به غلظت مورد انتظار است. همچنین برای محاسبه میزان درصد بازیابی اسپایک شده از معادله زیر استفاده می‌شود:

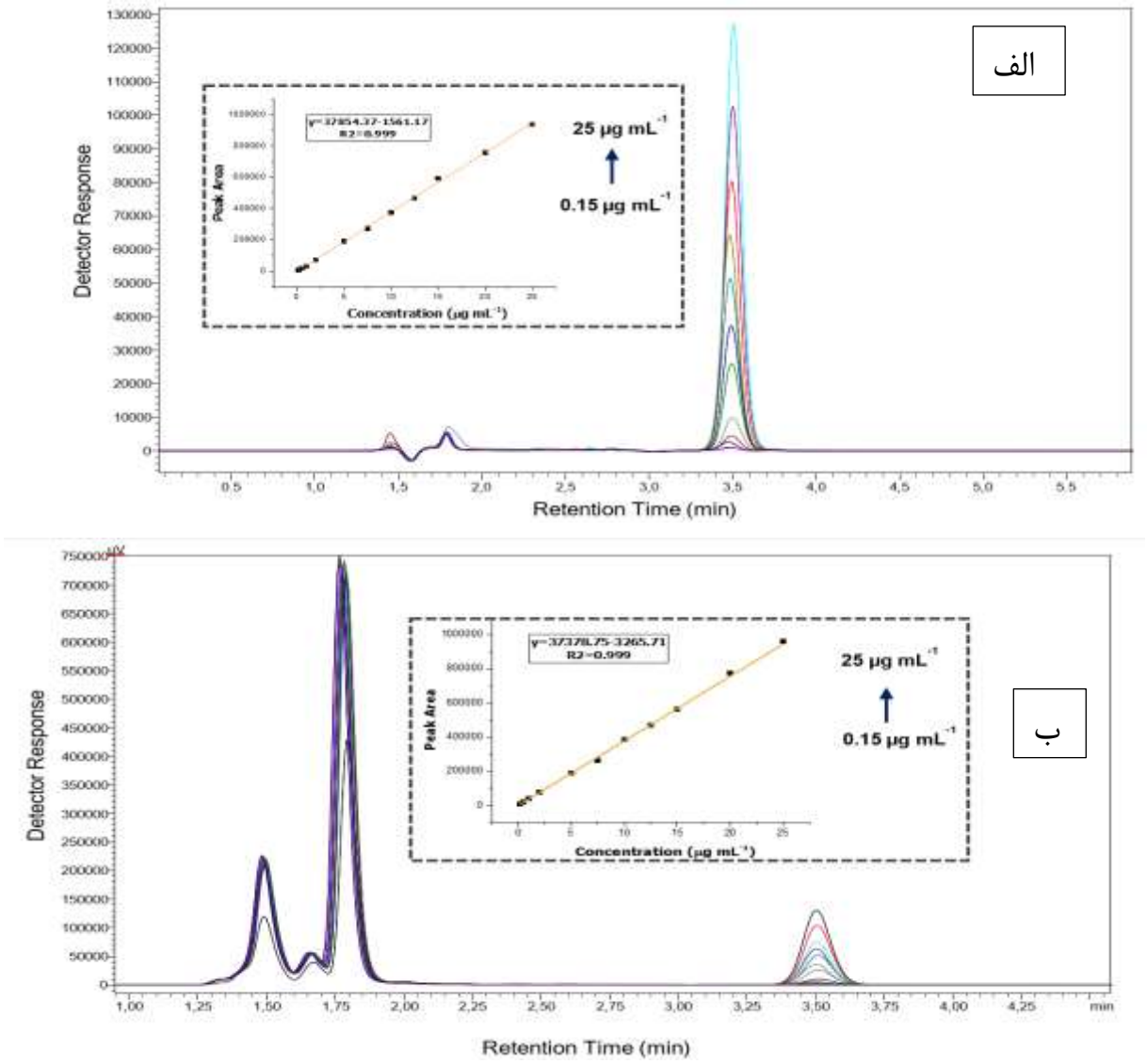
$$Spiking\ recovery\ \% = \frac{C_{found} - C_{real}}{C_{added}} \times 100$$

$C_{found}$ به غلظت آنالیت پس از افزودن مقدار معینی از ماده استاندارد به نمونه حقیقی اشاره دارد، $C_{real}$ به غلظت در نمونه حقیقی اشاره می‌کند، و $C_{added}$ به غلظت اضافه شده از ماده استاندارد که به نمونه حقیقی اسپایک شده است، اشاره دارد [۱۹, ۲۰]. در ارزیابی دقت، آنالیزهای تکراری برای نمونه‌های حقیقی انجام شد. انحراف معیار نسبی در یک محدوده قابل قبول بود، که نشان‌دهنده دقت می‌باشد. در این محاسبات، از مقادیر شیب و عرض از مبدا نمودارهای کالیبراسیون به دست آمده از ماتریس‌ها استفاده شد. جداول ۷ و ۸ به ترتیب برای نمونه سرم خون و اورین انسان نشان می‌دهد که درصد بازیابی بنیدیپین در هر سطح در محدوده ۹۷/۹۷-۱۰۶/۵۹ ٪ به دست آمده است.

جدول ۵- پارامترهای اعتبارسنجی بنیدیپین هیدروکلرید در نمونه سرم خون انسان

| پارامترهای اعتبارسنجی | نتایج |
|---|---|
| محدوده خطی ($mg\ L^{-1}$) | ۰/۱۵-۲۵/۰۰ |
| شیب | ۳۷۸۵۴/۳۷ |
| عرض از مبدا | -۱۵۶۱/۱۷ |
| ضریب همبستگی | ۰/۹۹۹ |
| انحراف استاندارد شیب | ۱۸۲/۱۱ |
| انحراف استاندارد عرض از مبدا | ۲۲۳/۰۴ |
| حد تشخیص ($\mu g\ L^{-1}$) (LOD) | ۱/۲۰ |
| حد کمی سازی($\mu g\ L^{-1}$) (LOQ) | ۳/۸۰ |
| * دقت بین‌روز(RSD%) | ۰/۱۸ |
| * دقت داخل‌روز(RSD%) | ۰/۳۳ |

* هر عدد میانگین ۵ آزمایش است.




شکل ۴- کروماتوگرام‌های معمول HPLC تحت شرایط بهینه شده در محدوده‌ی غلظتی ۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر تا ۲۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر در نمونه سرم خون (الف) و اورین انسان (ب). شکل داخلی نمایانگر نمودار کالیبراسیون در این بازه غلظتی می‌باشد.

جدول ۶- پارامترهای اعتبارسنجی بنیدیپین هیدروکلرید در نمونه اورین انسان

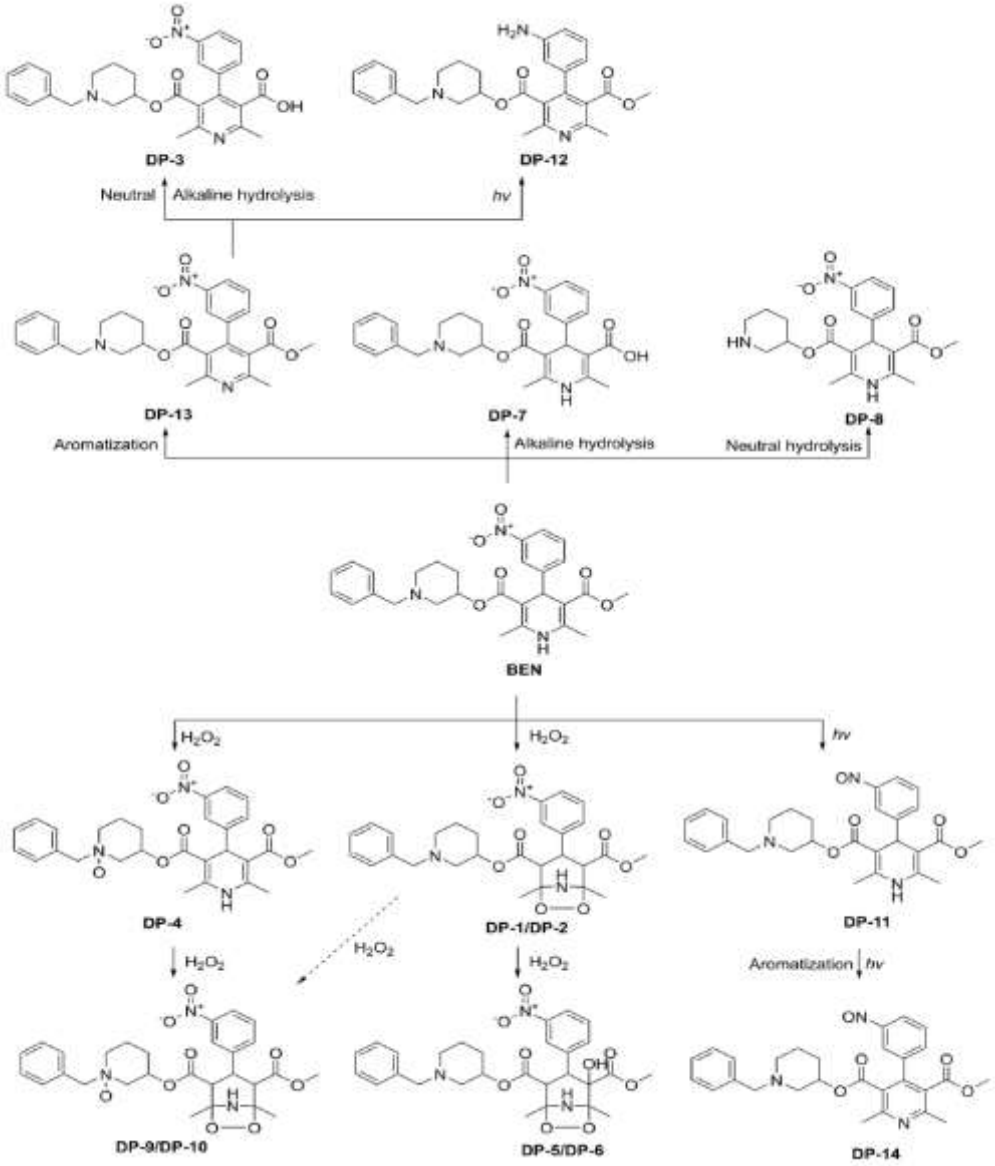
| پارامترهای اعتبارسنجی | نتایج |
|---|---|
| محدوده خطی ($mg\ L^{-1}$) | ۰/۱۵-۲۵/۰۰ |
| شیب | ۳۷۳۷۸/۷۵ |
| عرض از مبدا | -۳۲۶۵/۷۱ |
| ضریب همبستگی | ۰/۹۹۹ |
| انحراف استاندارد شیب | ۱۶۳/۵۲ |
| انحراف استاندارد عرض از مبدا | ۲۲۰/۴۵ |
| حد تشخیص ($\mu g\ L^{-1}$) (LOD) | ۸/۳۰ |
| حد کمی سازی($\mu g\ L^{-1}$) (LOQ) | ۲۷/۰۰ |
| * دقت بین‌روز(RSD%) | ۰/۳۱ |
| * دقت داخل‌روز(RSD%) | ۰/۶۶ |

* هر عدد میانگین ۵ آزمایش است.

### ۳-۳- بررسی رفتار تخریب بنیدیپین

محصولات تجزیه[۲] (DPs) در طول چرخه عمر یک ماده دارویی و/یا محصولات دارویی، زمانی که دارو در معرض شرایط استرس مختلفی سخت‌تر از شرایط پایدار تسریع‌شده قرار می‌گیرد، ایجاد می‌شوند. محصولات تجزیه بر کیفیت محصولات دارویی نهایی و خواص دارویی تأثیر می‌گذارند و می‌توانند منجر به عوارض جانبی خطرناک شوند. بنابراین، نهادهای مختلف نظارتی دارویی بر ضرورت انجام مطالعات تجزیه تحت استرس دارویی تأکید کرده و راهنماهایی برای انجام این مطالعات پیشنهاد کرده‌اند [۲۱, ۲۲]. مطالعات تخریب و تجزیه اجباری مطابق با دستورالعمل‌های ICH [۲۲] انجام شد که اطلاعات مفیدی در مورد رفتارهای تخریب و ویژگی‌های پایداری ذاتی تزریق بنیدیپین در شرایط استرس ارائه می‌کند (شکل پ۷). مسیر تخریب BEN در شکل ۵ نشان داده شده است. BEN تحت هیدرولیز (خنثی، اسیدی و قلیایی) به چهار محصول تجزیه‌ای، به نام‌های DP-3، DP-7، DP-8 و DP-13 تجزیه شد. در تجزیه اکسیداتیو، هشت محصول تجزیه‌ای (DP-1، DP-2، DP-4 تا DP-6، DP-9، DP-10 و DP-13) با مسیرهای مختلف تشکیل شدند. این دارو تحت تجزیه فتو لیتیک به DP-11، DP-12، DP-13 و DP-14 تجزیه شد (شکل ۵) [۲۳].

[2] Degradation products




شکل ۵- مسیر تخریب و تجزیه بنیدیپین هیدروکلرید در شرایط متفاوت [۲۳]

در مطالعه تخریب قلیایی بنیدیپین با NaOH ۰/۱ مولار (شکل پ۷ الف) با گذشت زمان تخریب بیشتر می‌شود و پس از ۲۵ ساعت تقریبا ۹ درصد تخریب می‌شود. همانطور که از شکل پ۷ ب فایل پیوست مشخص است با افزایش غلظت NaOH به ۱ مولار تخریب بیشتر شده و پس از ۲۵ ساعت به ۲۵ درصد می‌رسد.

در مطالعه تخریب اسیدی با HCl ۰/۱ مولار و ۱ مولار مشاهده شد که بنیدیپین به شدت در شرایط اسیدی غلیظ HCl ۱/۰ مولار ناپایدار بوده و صد درصد تخریب می‌شود (شکل پ۷ ج، د).

در تجزیه با هیدروژن پروکسید ۰/۳ و ۳ درصد به ترتیب پس از گذشت ۲۵ ساعت، حدود ۳/۵ درصد و ۱۲ درصد از بنیدیپین تخریب می‌شود (شکل پ۷ ه، و). همچنین برای مطالعه تخریب UV، بنیدیپین در معرض نور مستقیم UV قرار گرفت و فقط حدود ۱۱ درصد از بنیدیپین بعد از ۲۵ ساعت در معرض نور مستقیم UV تخریب می‌شود و بنابراین، بنیدیپین کمتر مستعد

تخریب UV است (شکل پ۷ ز). در تجزیه حرارتی ابتدا پودر بنیدیپین در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد در آون با دمای کنترل شده نگهداری شد و نتیجه مطالعه نشان داد که بنیدیپین کمتر مستعد تخریب در تخریب حرارتی است و بنابراین از نظر حرارتی پایدار می‌باشد (شکل پ۷ ح). تاثیر هر یک از این شرایط تخریب بر روی شکل پیک و همچنین زمان بازداری در شکل پ۸ نشان داده شده است.

جدول ۷- نتایج بازیابی بنیدیپین هیدروکلرید در نمونه سرم خون انسان

| | مقادیر | | | |
|---|---|---|---|---|
| مقدار واقعی ($mg\ L^{-1}$) | ۲/۰۰ | | | |
| مقدار پیدا شده ($mg\ L^{-1}$) | ۲/۰۱ | | | |
| RSD (%) * | ۰/۰۵ | | | |
| درصد خطای نسبی (٪) | ۰/۵۰ | | | |
| مقدار اسپایک شده ($mg\ L^{-1}$) | ۰/۵۰ | ۱/۰۰ | ۲/۰۰ | ۳/۵۰ |
| مقدار یافت شده ($mg\ L^{-1}$) | ۲/۵۵ | ۳/۰۳ | ۴/۰۹ | ۵/۵۲ |
| درصد بازیابی نسبی (RR%) | ۱۰۲/۰۰ | ۱۰۱/۰۰ | ۱۰۲/۱۵ | ۱۰۰/۴۲ |
| درصد بازیابی اسپایک (SR%) | ۱۱۰/۰۰ | ۱۰۳/۰۰ | ۱۰۴/۵۰ | ۱۰۰/۶۰ |
| RSD* برای ریکاوری درصد | ۰/۱۲ | ۰/۰۹ | ۰/۱۰ | ۰/۱۲ |

* هر عدد میانگین ۵ آزمایش است.

جدول ۸- نتایج بازیابی بنیدیپین هیدروکلرید در نمونه اورین انسان

| | مقادیر | | | |
|---|---|---|---|---|
| مقدار واقعی ($mg\ L^{-1}$) | ۲/۰۰ | | | |
| مقدار پیدا شده ($mg\ L^{-1}$) | ۲/۰۷ | | | |
| RSD (%) * | ۰/۱۸ | | | |
| درصد خطای نسبی (٪) | ۳/۵۰ | | | |
| مقدار اسپایک شده ($mg\ L^{-1}$) | ۰/۵۰ | ۱/۰۰ | ۲/۰۰ | ۳/۵۰ |
| مقدار یافت شده ($mg\ L^{-1}$) | ۲/۵۵ | ۳/۱۴ | ۴/۰۱ | ۵/۳۸ |
| درصد بازیابی نسبی (RR%) | ۱۰۲/۰۰ | ۱۰۴/۶۶ | ۱۰۰/۲۵ | ۹۷/۸۱ |
| درصد بازیابی اسپایک (SR%) | ۱۱۰/۰۰ | ۱۱۴/۰۰ | ۱۰۰/۵۰ | ۹۶/۵۷ |
| RSD* برای ریکاوری درصد | ۰/۱۸ | ۰/۱۹ | ۰/۱۰ | ۰/۱۶ |

* هر عدد میانگین ۵ آزمایش است.

## ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، یک روش ساده، سریع، دقیق و قابل اعتماد برای اندازه‌گیری داروی بنیدیپین در نمونه‌های دارویی، سرم انسان و نمونه اورین توسعه داده شد. جدول ۹، عملکرد تجزیه‌ای (LDR ،LOQ ،LOD) روش پیشنهادی را برای داروی بنیدیپین با سایر مقالات چاپ شده برای اندازه‌گیری بنیدیپین، مقایسه می‌کند. از آنجایی که تشخیص آنالیت در سطح بسیار کم حائز اهمیت است، روش پیشنهادی، عملکردی قابل مقایسه و حتی برتر، از نظر سادگی (آماده‌سازی حداقلی نمونه)، سرعت، قابلیت تکرار و حساسیت را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده در محدوده تعیین شده مطابق دستورالعمل ICH است. ستون تجزیه‌ای استفاده

شده، و فاز متحرک، جداسازی خوبی را فراهم می‌کنند و نتایج واضحی را ارائه میدهند. زمان بازداری خوب و قابل قبولی برای دارو بدست آمد، و در نتیجه زمان کوتاهتری برای تجزیه و آنالیز بنیدیپین با این روش مورد نیاز است. نتایج آزمایشگاهی نشان می‌دهد که گستره دینامیکی خطی (LDR) روش برای آنالیت از ۰/۱۵ تا ۲۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر ($mg\ L^{-1}$) بوده است. ضریب همبستگی ($R^2$) به‌دست‌آمده ۰/۹۹۹ است. حد تشخیص و حد کمی سازی به ترتیب ۰/۴۶ و ۱/۵۰ میکروگرم بر لیتر ($\mu g\ L^{-1}$) محاسبه شد. درصد انحراف معیارهای نسبی (RSD) بین‌روز و درون روز به ترتیب ۰/۱۳ و ۰/۲۷ درصد است. همچنین، بررسی رفتار بنیدیپین زمانیکه در معرض تخریب اجباری با استفاده از شرایط تنش متعدد قرار گرفت، با روش پیشنهادی انجام شد. در شرایط تنش هیدرولیتیک، اکسیداتیو و فتولیتیک، بنیدیپین هیدروکلرید تجزیه شده و ۱۴ محصول تجزیه تشکیل داده است. همچنین، مشخص شد که BEN در برابر تخریب حرارتی پایدار است. لذا، پایداری BEN و محصولات دارویی آن می‌تواند با محافظت از آن‌ها در برابر رطوبت، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مناسب و محافظت از آن‌ها در برابر نور افزایش یابد. بازیابی‌های قابل تکرار برای آنالیت در نمونه‌ها حاصل شد و درصد بازیابی‌های نسبی نمونه‌های اسپایک شده در محدوده مناسب ۱۰۵–۹۷ ٪ به دست آمد. بنابراین، می‌توان از این روش برای آنالیز معمول در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت استفاده کرد.

جدول ۹–مقایسه روش پیشنهادی با سایر کارهای منتشر شده برای اندازه‌گیری بنیدیپین با سایر روش‌ها

| مرجع | زمان آنالیز (min) | حجم نمونه µL | LDR (mg/L) | LOD (mg/L) | RSD | نمونه حقیقی | دستگاه/بستر | روش |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| [۱] | ۵/۰۰ | ۲۰/۰۰ | ۰/۲۵-۱۵/۰۰ | ۰/۰۲ | ۰/۱۴ | دارو | HPLC-DAD | کروماتوگرافی مایع-فاز معکوس |
| [۱] | - | - | ۳/۲۵-۵۴/۲۰ | ۰/۰۳ | ۰/۱۶ | دارو | الکترود کربن شیشه‌ای | الکتروشیمی (DPV) |
| [۲] | ۷/۰۰ | ۲۰/۰۰ | ۴/۰۰-۱۲/۰۰ | ۰/۲۰ | ۱/۱۸ | دارو | HPLC-UV | کروماتوگرافی مایع-فاز معکوس |
| [۲۴] | ۴/۵۷ | ۱۰/۰۰ | ۲/۰۰-۶/۰۰ | ۴/۰۰ ×۱۰$^{-۳}$ | | دارو | HPLC- PDA | کروماتوگرافی مایع-فاز معکوس |
| [۲۵] | - | - | ۳/۰۰-۱۸/۰۰ | ۰/۲۰ | ۰/۶۸ | - | Shimadzu UV-1800 | اسپکتروسکوپی UV |
| [۲۶] | - | - | ۰/۲۰-۲/۰۰ | ۰/۵۸ | ۰/۱۱ | دارو | Shimadzu 2600 UV/Vis | اسپکتروفتومتری مشتقی مرتبه اول |
| [۲۷] | ۸/۰۰ | ۱۰/۰۰ | ۱/۰۰-۴۰۰/۰۰ | ۵/۰۰ ×۱۰$^{-۳}$ | ۰/۵۲ | وزیکول‌های لیپیدی | HPLC-UV | کروماتوگرافی مایع |
| کار حاضر | ۴/۰۰ | ۱۵/۰۰ | ۰/۱۵-۲۵/۰۰ | ۴/۶۰ ×۱۰$^{-۴}$ | ۰/۱۳ | دارو-سرم خون و اورین | HPLC-UV | کروماتوگرافی مایع-فاز معکوس |

RSD: انحراف استاندارد نسبی

LOD: حد تشخیص

LDR: محدوده پویایی خطی

PDA: آرایه فتودیود

DPV: ولتاموگرام پالس تفاضلی

## ۵- تقدیر و تشکر

نویسنده مقاله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه یاسوج تشکر و قدردانی می‌کند.

## ۶- فهرست منابع و ماخذ

[1] Karadaş Bakırhan, N., Şanlı, S., Gümüştaş, M., & Özkan, S. A. (2012). Voltammetric and RP-LC assay for determination of benidipine HCl.

[2] Patel, D. M., Patel, D., Patel, A., Sheth, A., & Shah, U. J. (2019). Method development and validation for simultaneous estimation of benidipine hydrochloride and metoprolol succinate in tablet. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 9(6-s), 28-33.

[3] Yao, K., Nagashima, K., & Miki, H. (2006). Pharmacological, pharmacokinetic, and clinical properties of benidipine hydrochloride, a novel, long-acting calcium channel blocker. Journal of pharmacological sciences, 100(4), 243-261.

[4] Kumar, M., Shukla, A. K., Bishnoi, R. S., & Jain, C. P. (2018). Development of UV spectrophotometric method for the determination of benidipine hydrochloride by using quality by design (QbD) approach. International Journal of Applied Pharmaceutics, 10(4), 92-97.

[5] Al-Japairai, K. A., Mahmood, S., Abdul-Halim, N., & Almurisi, S. H. (2023). A New and Rapid UV-Visible Spectrophotometric Method for Benidipine Hydrochloride Determination: Development and Validation. Pharmaceutical Chemistry Journal, 56(11), 1506-1511.

[6] Mohanbhai, P. L., Mustaqhusen, M. S., Kamleshbhai, J. A., & Liyakatali, K. M. (2018). SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF BENIDIPINE HYDROCHLORIDE IN PHARMACEUTICAL FORMULATION: UV-spectrophotometric method for estimation of benidipine hydrochloride in pharmaceutical formulation. Tropical Journal of Pharmaceutical and Life Sciences, 5(1), 01-07.

[7] Karasaka, A. (2015). First order derivative spectrophotometric method for the determination of benidipine hydrochloride pharmaceutical preparations and forced degradation study. Optics and Spectroscopy, 118, 1002-1006.

[8] Shirkhodayekashani, M., Ghoreishi, S. M., Ghani, M., & Maleki, B. (2023). Dendritic Poly (amidoamine) Functionalized with Magnetic Nanoparticles as Sorbent for Simultaneous Magnetic Solid-Phase Extraction of Miconazole, Clotrimazole and Tioconazole Followed by Determination via HPLC-UV. Applied Chemistry Today, 18(69), 45-56.

[9] Rajabi, M., & Ghazaghi, M. (2013). Application of dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of cetrimonium bromide in water samples. Applied Chemistry Today, 8(27), 21-26.

[10] Talaee, M., Lorestani, B., Ramezani, M., Cheraghi, M., & Jamehbozohbozorgi, S. (2019). Simple determination of Sudan dyes in fruit juice and spices by microfunnel-filter-based emulsification

microextraction followed by high performance liquid chromatography. Applied Chemistry Today, 14(53), 125-134.

[11] Azaresh, E., & Rajabi, M. (2020). Determination of anti-dementia drugs in wastewater, serum and human urine samples by hollow fiber liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. Applied Chemistry Today, 15(56), 39-50.

[12] Ahmadi Abd, B., Hasheminasab, K. S., Payehghadr, M., & Shahbazi, K. (2021). Measurement of free amino acids in soil and fertilizer samples using high performance liquid chromatography equipped with ultraviolet detector. Applied Chemistry Today, 16(59), 21-32.

[13] Masoum, S., Samadi, N., Mehrara, B., & Akhgari, M. (2019). Identification of potential antioxidant compounds in the Juglans regia L.(walnut) leaves using HPLC-MS and linear multivariate calibration methods. Applied Chemistry Today, 14(51), 193-212.

[14] Algan, A. H., Gumustas, M., Karatas, A., & Ozkan, S. A. (2016). A selective and sensitive stability-indicating HPLC method for the validated assay of etoposide from commercial dosage form and polymeric tubular nanocarriers. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 124, 382-389.

[15] Agency EM. (2011). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Prescrire Int, 20,278.

[16] ICH, D. R. G. (2003, February). Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2). In Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva.

[17] McPolin, O. (2009). Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis. Lulu. com.

[18] Kurangi, B., Jalalpure, S., & Jagwani, S. (2019). A validated stability-indicating HPLC method for simultaneous estimation of resveratrol and piperine in cubosome and human plasma. Journal of Chromatography B, 1122, 39-48.

[19] Younesi, Z., Mohammadzadeh, S., Ghani, M., Tajbakhsh, M., & Younesi, H. (2025). Magnetic MCM-41 functionalized with ureathiosemicarbazone monohydrate as the sorbent for magnetic solid-phase extraction of triazole fungicides from fruit samples followed by measuring using high performance liquid chromatography. Microchemical Journal, 208, 112559.

[20] Ahmadi, A., Alinezhad, H., Sarrafi, Y., & Ghani, M. (2024). Nanoporous carbon derived ZIF-67@ MWCNTs-Fe3O4 reinforced hollow fiber to performe hollow fiber solid-phase micro extraction (HF-SPME) coupled with high-performance liquid chromatography to determine deltamethrin and cypermethrin. Journal of Food Composition and Analysis, 136, 106750.

[21] Guideline, I. H. T. (1996). Stability testing: photostability testing of new drug substances and products Q1B. Geneva: ICH, 172.

[22] Ich, I. C. H. (2003). Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products, 4(February), 24.

[23] Kushwah, B. S., Thummar, M. M., Yadav, A. S., Dhiman, V., & Samanthula, G. (2023). Development of stability-indicating method for separation and characterization of benidipine forced degradation products using LC–MS/MS. Biomedical Chromatography, 37(1), e5517.

[24] Jagadeesh, K., & Annapurna, N. (2020). Stability indicating method to analyze benidipine and chlorthalidone using HPLC technique: Establishment, validation and application to tablets. Pharmaceutical Sciences, 26(1), 75-81D.

[25] Kumar, M., Shukla, A. K., Bishnoi, R. S., & Jain, C. P. (2018). Development of UV spectrophotometric method for the determination of benidipine hydrochloride by using quality by design (QbD) approach. International Journal of Applied Pharmaceutics, 10(4), 92-97.

[26] Karasaka, A. (2015). First order derivative spectrophotometric method for the determination of benidipine hydrochloride pharmaceutical preparations and forced degradation study. *Optics and Spectroscopy*, *118*, 1002-1006.

[27] Khater, A. J., Mahmood, S., Arifin, M. A. B., Abdul-Halim, N., & Almurisi, S. H. (2022). Development and validation of HPLC method for determination of benidipine hydrochloride in lipid vesicles formulations. International Journal of Membrane Science and Technology, 9(2), 40-47.